

MISE EN ÉVIDENCE DE DIFFÉRENTS TYPES DE GLYCOPROTÉINES DANS UN EXTRAIT INHIBITEUR DE LA GAMÉTOGÈNE CHEZ *ENTEROMORPHA PROLIFERA*, CHLOROPHYCÉE MARINE

Sigurdur JÓNSSON*, Marie-Hélène LAUR*, Liem PHAM-QUANG*

RÉSUMÉ. — L'extrait hydrosoluble de thalles végétatifs de l'*E. prolifera* (Müller) J. Agardh inhibe la gamétogénèse chez cette espèce. Des études biochimiques de cet extrait ont permis de mettre en évidence cinq types de glycoprotéines, en deux groupes dont les poids moléculaires sont respectivement de l'ordre de 25.000 et 43.000. Les fractions glucidiques sont représentées par le glucose, le fucose ou le rhamnose, la galactose et un peu de mannose, certains de ces sucres étant associés à des acides sialiques (NANA).

SUMMARY. — The water soluble extract from vegetative thalli of *E. prolifera* inhibits gametogenesis in this species. This extract was found to contain 5 types of glycoproteins, in two pools with molecular weight of about 25.000 and 43.000 respectively. The sugar components identified were glucose, fucose or rhamnose, galactose and traces of mannose, associated, in part, with sialic acids (NANA).

MOTS CLÉS : glycoprotéines, inhibition, gamétogénèse, *Enteromorpha*.

INTRODUCTION

Des études expérimentales ont permis de démontrer qu'il existe chez deux espèces de Chlorophycées marines, *Ulva mutabilis* (NILSEN et NORDBY, 1975) et *Enteromorpha prolifera* (JÓNSSON, 1977, 1983) un complexe inhibiteur de la reproduction. Cet inhibiteur, diffusible dans le milieu, réprime toute reproduction durant la vie végétative des algues, alors qu'après sa libération, réalisable sur le vivant, les cellules des thalles peuvent se transformer en gamètes ou en spores, selon la phase du cycle. Des données plus anciennes suggèrent qu'il existe un contrôle négatif analogue dans diverses autres espèces d'algues

* Laboratoire de Biologie Végétale Marine - Université Pierre et Marie Curie, Bâtiment I, 4 place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05.

(BÜHNEMANN, 1955; KÖHLER, 1956; HUSTEDE, 1957; LERSTEN et VOTH, 1960).

La nature biochimique de l'inhibiteur a été étudiée dans le cas des sporophytes d'*Ulva mutabilis* (NILSEN et NORDBY, 1975). Il serait constitué de protéines à faibles poids moléculaires, associées à des polysaccharides sulfurés de type ulvine. Relativement instable vis-à-vis de la température, du pH, de l'évaporation, cette substance serait aussi labile et partiellement volatile.

D'autre part, il a été démontré que le filtrat inhibiteur de la gamétogenèse chez *Enteromorpha prolifera* contient des acides sialiques ou des glycoprotéines apparentées; ces composés sont localisés à la surface des cellules des thalles végétatifs (LAUR et JÓNSSON, 1983).

L'objet du présent travail est de préciser la constitution des glycoprotéines de l'extrait inhibiteur de la gamétogenèse de l'*Enteromorpha prolifera*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

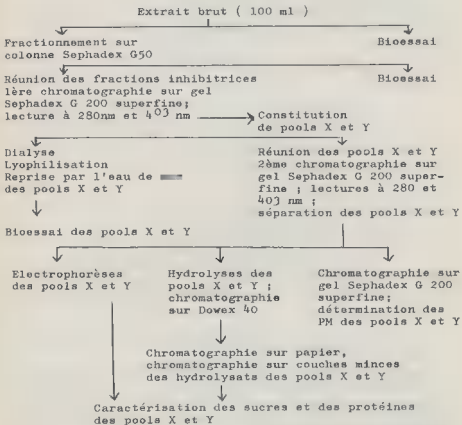
Matériel et culture : Nos études portent sur les gamétophytes stériles de l'*E. prolifera* clonés en cultures à partir de zoospores quadriflagellées, et après induction expérimentale d'une seule plante sporophytique, selon une méthode déjà décrite (JÓNSSON, 1977, 1983; LAUR et JÓNSSON, 1983; voir tests biologiques). Les cultures sont d'abord placées à 16°C, dans de l'eau de mer enrichie (PROVASOLI, 1968), sous un éclairage blanc froid de 60 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, en photopériodes de 16 / 8. Après une croissance rapide, durant deux semaines, les algues sont transférées à 8°C, ce qui a pour effet de les maintenir à l'état végétatif pendant plusieurs mois.

Extraction : Environ 3 grammes de thalles frais, âgés de 3 mois, sont fragmentés au hachoir électrique. Les morceaux tubulaires, longs d'environ 0,5 mm, sont soigneusement rincés à l'eau de mer, puis recueillis sur un tamis. Ces fragments, mis en suspension dans 100 ml d'eau de mer, sont alors soumis à une agitation modérée durant 5 heures. Le filtrat est récupéré après passage de la suspension sur verre fritté (n° 4). Toutes ces opérations sont menées à la température du laboratoire. Une aliquote est prélevée pour juger du pouvoir inhibiteur du filtrat, dont le reste est utilisé pour les différentes analyses biochimiques.

Méthodes biochimiques : Le tableau I résume le protocole d'analyse suivi au cours de cette étude.

La chromatographie sur colonne de verre (2 x 50 cm) garnie de gel Sephadex G 50 est réalisée à pH 7,2-7,4 (tampon phosphate). La colonne chromatographique (2 x 10 cm) sur gel Sephadex G 200 superfine (tampon phosphate pH 8,0-8,2) est couplée à un collecteur de fractions et à un spectrophotomètre avec lectures des densités optiques à 280 puis 403 nm (Pharmacia). Avant la chroma-

TABLEAU I : Protocole des analyses biochimiques de l'extrait inhibiteur de la gamétogenèse de l'Enteromorpha prolifera .



tographie, les deux types de colonne sont équilibrés toute une nuit à l'eau de mer.

Deux sortes d'électrophorèses ont été réalisées : la première sur gel polyacrylamide à gradient de saccharose dans un tampon tris-borate (pH 8,2) durant 24 h sous 50 v et colorations [bleu de Coomassie et acide périodique Schiff (P.A.S.)]; la seconde est une électrophorèse de zone à gradient de densité de saccharose, sur papier, tampon véronal sodique (pH 8,6, 16 h, 50 v) suivie, soit d'une coloration au noir amide, soit du test à l'orcinol chlorhydrique.

Les poids moléculaires des fractions sont évalués, d'une part d'après les valeurs des densités optiques lues à 280 et 403 nm, et, par extrapolation, à partir des courbes obtenues pour des protéines connues (sérum albumine de bœuf : SAB, ovalbumine, lysozyme), d'autre part, à titre de contrôle, à l'aide de la série de calibrations des protéines (Kit Pharmacia).

L'analyse chimique des pools X et Y comporte une hydrolyse acide (SO_4H_2 , 0,1 N, 1 h, 80°C) et neutralisation à pH 6 de l'hydrolysate. Après centrifugations séparées, les 2 surnageants sont chromatographiés sur Dowex 40 (colonne : 1×8 cm, Dowex 40 (200-400 mesh) forme H^+). Une première élution à l'eau distillée fournit les sous-fractions F 1 (200 ml), la seconde par l'acide formique (0,3 N), les sous-fractions F 2 (50 ml). Ces sous-fractions, dialysées contre l'eau distillée, lyophilisées, reprises par 2 ml d'eau distillée sont alors chromatographiées [sur papier Whatman n° 3 (CP) et couches minces (CM)] en présence d'étalons internes et de témoins.

Les hexoses sont recherchés par chromatographies sur papier et révélations à l'anthrone (SCOTT et MELVIN, 1953; DISCHE et SHETTLES, 1948, 1951), complétées par les lectures spectrophotométriques à 396 et 430 nm. Les hexosamines (NAG) sont détectées selon la méthode modifiée de ELSON et MORGAN, utilisant le réactif de EHRlich (DISCHE, 1962) et lectures des densités optiques à 530 nm.

Les acides sialiques (NANA) sont décelés par action de l'acide thiobarbiturique avec lectures à 535 nm (WARREN, 1959), la paradiméthylaminobenzaldéhyde (pDMAB) (WERNER et ODIN, 1952) du réactif à l'orcinol (SVENNERHOLM, 1957 a et b) et de la diphenylamine (WERNER et ODIN, 1952).

La détermination et la caractérisation complémentaire des protéines ont été réalisées selon la méthode de LOWRY et al. (1951) avec lectures à 750 nm, les réactions à la ninhydrine et au biuret avec lectures à 450 nm (GORNALL et al., 1949).

Bioessais : L'extrait brut et ses différentes fractions sont essayés afin de juger de leur activité inhibitrice sur la gamétogenèse.

Environ 50 fragments d'algues stériles (10^5 cellules environ), âgées de trois mois, sont soigneusement rincés à l'eau de mer naturelle et placés dans la solution d'eau de mer du produit à essayer. Un lot identique de fragments d'algues mis, lui aussi, en eau de mer, constitue le témoin, les volumes de milieu étant dans les deux cas égaux.

Les bioessais sont effectués à 18°C , sous éclairage blanc froid fluorescent de $60 \mu\text{m Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ en photopériode $16/8$.

L'état de la gamétogenèse est évalué dans les différents lots dès que le témoin fructifie, ce qui se réalise généralement au bout de trois jours. Les degrés d'inhibition s'apprécient en évaluant au microscope la surface stérile des fragments. Selon cette appréciation, les fragments sont répartis dans les classes d'inhibition suivantes : classe 0 : 0%; 5 : 1 à 10%; 30 : 11 à 50%; 70 : 51 à 90%; 100 : 91 à 100%.

Le pourcentage d'inhibition s'obtient par la moyenne arithmétique des classes, selon une méthode inspirée de NILSEN et NORDBY (1975). La marge d'erreur entre séries expérimentales et parallèles est de 5 à 10%.

RÉSULTATS

La figure 1 met en évidence les taux d'inhibition présentés par les six fractions éluées sur gel de Sephadex G 50, à partir de l'extrait brut, comparativement à l'extrait brut et à l'eau de mer naturelle (témoin).

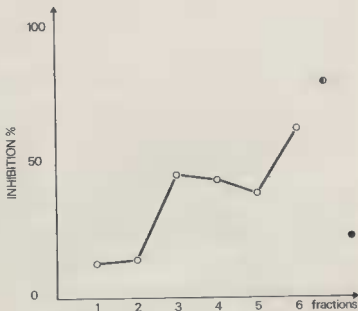


Figure 1. — Action des éluats issus de la chromatographie sur gel Sephadex G 50 (C—O), de l'extrait brut (●) et de l'eau de mer naturelle (●, témoins) sur la gamétogenèse chez *E. prolifera*.

L'extrait brut bloque la gamétogenèse à 80 %, alors que l'inhibition est d'environ 20 % pour le témoin placé en eau de mer naturelle seule. Après la chromatographie sur colonne, on constate que les deux premiers éluats inhibent fort peu la gamétogenèse, alors que, pour les suivants (3, 4, 5 et 6), la moyenne atteint ou dépasse 50 %.

Ces fractions actives (3 à 6), rassemblées, sont alors chromatographiées sur colonne de gel Sephadex superfine G 200. La figure 2 indique les valeurs des densités optiques des 80 sous-fractions, lues à 280 nm (fig. 2a), puis à 403 nm (fig. 2b). Deux pics, désignés X et Y, émergent dans ces deux analyses, soulignant deux substances différentes.

TABLEAU II : Constituants des glycoprotéines des fractions X et Y .

+ = 20 à 30 %

++ = 30 à 60 %

+++ = 60 %

trace = 1 %

Fractions	Glyco-protéines	PM	teneur	Rf	Constituants moléculaires					
					Protéines	NANA	Fucose ou Rhamnose	Glucose	Galactose	Mannose
X	GP ₁	25.000	=	0,24	+	++	+	++	++	+
	GP ₂		+++	0,50	+	+	++	++	++	0
	GP ₃		++	0,78	+	++	+	+	+	trace
Y	GP ₁	43.000	++	0,24	++	trace	trace	++	+	0
	GP ₄		+	0,30	+	++	+	++	+	+
	GP ₅		+++	0,70	++	++	trace	+	+	trace

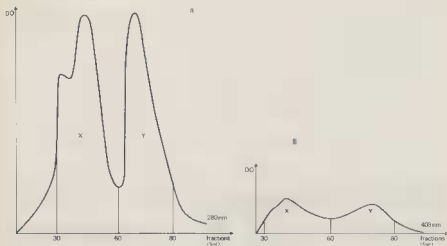


Figure 2. — Densité optique des 80 sous-fractions obtenues par chromatographie sur gel Sephadex G 50; a : lecture à 280 nm; b : lecture à 403 nm.

Une aliquote de X et de Y, après dialyse, concentration, lyophilisation, redissolution dans l'eau de mer (2 ml) est soumise aux bioessais, parallèlement au témoin (fig. 3). Après trois jours d'essai, on constate que l'inhibition de la gamétogénèse est nulle chez le témoin, tous les fragments ayant fructifié, mais elle est de 100 % pour les fragments placés dans les solutions provenant de X ou de Y. Toutefois, en prolongeant au-delà de trois jours le séjour des fragments dans les solutions X et Y, il y a levée progressive de cette inhibition qui devient alors totale en huit jours.

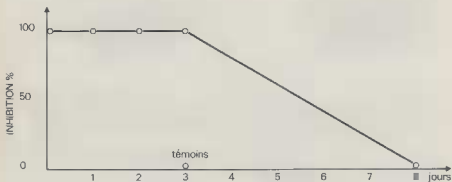


Figure 3. — Bioessais des pools X et Y, après dialyse, lyophilisation et reprise à l'eau de mer, comparativement aux témoins placés à l'eau de mer naturelle.

Les fractions restantes des solutions X et Y font l'objet de différentes électrophorèses, d'hydrolyse et de chromatographies. Les résultats sont consignés dans les tableaux II et III, et illustrés par les figures 4 et 5.

TABLEAU III : Caractérisations des constituants des fractions X et Y hydrolysées .

+ = présent ; trace 1 % ; 0 = pas de coloration positive.

CONSTITUANTS	TESTS ANALYTIQUES UTILISÉS	X	Y		
PROTÉINES	Riuret	+	+		
	Lowry	+	+		
	Ninhydrine	+	+		
	Chromatographie CM	+	+		
	Electrophorèse de zone	Bleu de Coomassie Noir amide	+	+	
GLUCIDES	Thiobarbiturique (NANA)	+	+		
	pDMAB(NAG)	trace	0		
	PAS	Glucose	+	+	
		Orcinol	Fucose ou Rhamnose	+	+
			Mannose	+	+
		Galactose	+	+	

Il apparaît que les pools X et Y, regroupés et purifiés par passage sur colonne de gel Sephadex G 200 superfine, lus au spectrophotomètre (280 et 403 nm), contiennent des substances caractérisées par des vitesses d'élutions et des densités optiques différentes (fig. 4).

La fraction X (fig. 5, tableau II), dont le poids moléculaire est de l'ordre de 25.000, est composée de trois types de glycoprotéines : G P₁ (Rf : 0,24), G P₂ (Rf : 0,50) et G P₃ (Rf : 0,78). Les révélations (bleu de Coomassie et P.A.S.) indiquent que la glycoprotéine G P₂ est la plus abondante. Ces glycoprotéines complexes sont formées de protéines, associées aux acides sialiques, aux hexoses tels que fucose ou rhamnose, glucose, galactose, avec traces de mannoses (tableaux II et III).

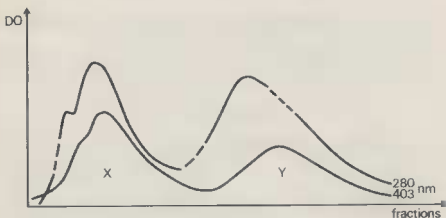
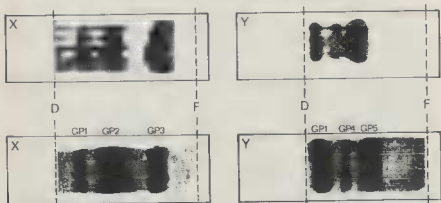


Figure 4. — Densité optique, lue à 280 nm et 403 nm, des pools X et Y regroupés (deuxième chromatographie sur gel Sephadex G 200 superfine).

Coloration au bleu de Coomassie | BdC



Coloration au P.A.S.

Figure 5. — Électrophorèses sur gel polyacrylamide à gradient de saccharose à pH 8,2, dans un tampon tris-borate (0,15 M, 50 v, 24 h) des pools X et Y issus de la deuxième chromatographie sur gel Sephadex G 200 superfine, après coloration au bleu de Coomassie et P.A.S.; G₁, G₂, G₃, G₄, G₅ : différents types de glycoprotéines; D : dépôt du solvant; F : front du solvant.

La fraction Y, de poids moléculaire apparent 43.000, comporte également trois glycoprotéines : G P₁ (R_f : 0,24), G P₄ (R_f : 0,30) et G P₅ (R_f : 0,70), cette dernière étant la plus abondante. Les constituants de ces diverses glyco-

protéines diffèrent également de ceux de la fraction X, tant par leurs teneurs en protéines que par la nature et leur teneur en sucres (tableau II).

L'analyse par les mêmes méthodes de l'eau de mer naturelle utilisée au cours de cette étude n'a permis, à titre de contrôle, de déceler ni protéine, ni sucre.

DISCUSSION

Il semble donc que la ou les substances inhibant la gamétogenèse chez l'*Enteromorpha prolifera* appartiennent à des glycoprotéines complexes, dont les composants-sucres diffèrent.

Nos résultats suggèrent que ces molécules sont fragiles car, après leurs séparations (chromatographie, lyophilisation...), le pouvoir inhibiteur s'atténue considérablement. Cette constatation rejoint celle de NILSEN et NORDBY (1975) à propos de l'inhibiteur de la sporulation de l'*Ulva mutabilis*.

Les résultats donnés ici sont relatifs à une série d'expériences et d'analyses. D'autres séries ont conduit à des variations dans les estimations. Par exemple, nous avons noté que, si la colonne chromatographique (gel Sephadex G 50, tampon phosphate) est utilisée sans équilibrage préalable à l'eau de mer (au moins 12 h), les premiers éluats, à partir de l'extrait brut, sont létaux. Il en est de même des premières fractions récoltées par chromatographie de l'eau de mer naturelle seule. Dans ces deux cas, c'est probablement le tampon phosphate qui intervient et entraîne la mort des algues.

La levée d'inhibition de la gamétogenèse constatée après un contact prolongé avec les substances X et Y (cf. figure 3) pourrait être due à une variation du pH, voire à la dénaturation des inhibiteurs par des facteurs encore inconnus, endogènes ou exogènes.

Des glycoprotéines interviennent à différents niveaux dans la reproduction chez les algues. STARR et JAENICKE (1980) rapportent, chez *Volvox carteri f. nagariensis*, la présence d'une hormone sexuelle mâle constituée d'une glycoprotéine (PM : 25.700 à 30.000 d) ne comportant qu'une chaîne de polypeptides et une teneur élevée en sucres (45 %), dépourvue d'acides uroniques et de désoxy sucres. Cette hormone induit la sexualisation des gonidies (JAENICKE, 1984). Des glycoprotéines, hautement spécifiques, interviennent aussi dans le mécanisme de contact entre les cellules sexuelles chez *Chlamydomonas*, en assurant leur agglutination (WIESE et WIESE, 1975; KLIS et al., 1984). WILLIAMS (1981) a montré que ces substances renferment du N-acétylgalactosamine. L'action de ces glycoprotéines paraît essentiellement inductrice et non pas inhibitrice comme chez l'*E. prolifera*. Il faut aussi signaler que certaines hormones sexuelles identifiées chez les algues ne sont pas de nature glycoprotéique. Ainsi les substances responsables de l'attraction des gamètes chez les algues brunes seraient des oléfines ou des hydrocarbures insaturés (MÜLLER et al., 1982; MAIER et MÜLLER, 1984).

Différents types de glycoconjugués, surtout des glycoprotéines, ont maintenant pu être mis en évidence à la surface des cellules végétatives dans divers groupes d'algues à l'aide de lectines (von SENGEBUSCH et MÜLLER, 1983). Chez le *Dunaliella tertiolecta* cette méthode a révélé l'existence de glycoprotéines membranaires où le composant-sucre est essentiellement formé de l'acide sialique et/ou du N-acétyl-D-glucosamine (KLUT et al., 1983), ce qui est en accord avec nos résultats concernant la présence d'acide sialique à la surface des cellules végétatives de l'*E. prolifera* (LAUR et JÓNSSON, 1983).

La fonction des glycoprotéines membranaires est encore mal élucidée chez les végétaux. Nos études chez l'*E. prolifera* montrent que les glycoprotéines pourraient intervenir dans le contrôle de l'induction de la reproduction à titre d'inhibiteur. L'élimination de telles glycoprotéines déclencherait l'initiation des phénomènes biochimiques de dédifférenciation des cellules végétatives conduisant à la formation de gamètes ou spores.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BÜHNEMANN F., 1955 — Untersuchungen über einen Sporulations- und Wachstums-hemmstoff in *Oedogonium*-Kulturen. *Arch. Mikrobiol.* 23 : 14-27.
- DISCHE Z., 1962 — Color reactions of hexosamine. In WHISTLER R.L. et WOLFROM M.L. (Eds.) *Methods in carbohydrate chemistry*, Acad. Press, N.Y. et London, vol. 1. 507-512.
- DISCHE Z. et SHETTLES L.B., 1948 — A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.* 175 : 595-603.
- DISCHE Z. et SHETTLES L.B., 1951 — A new spectrophotometric test for the detection of methylpentose. *J. Biol. Chem.* 192 : 579-582.
- GORNALL A.G., BARDAWILL C.J. et DAVID M.M., 1949 — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177 : 751-766.
- HUSTEDE H., 1957 — Untersuchungen über die stoffliche Beeinflussung der Entwicklung von *Stigeoclonium falklandicum* and *Vaucheria sessilis* durch Tryptophanabkömmlinge. *Biol. Zentralbl.* 79 : 555-595.
- JAENICKE L., 1984 — Signals and events in the differentiation of *Volvox*. 4e Congrès de la fédération des Sociétés Européennes de Physiologie Végétale, Strasbourg, 29/7 à 3/8 1984 : 357-358.
- JÓNSSON S., 1977 — Contrôle expérimental de la gamétogenèse chez l'*Enteromorpha prolifera*, Chlorophycée marine. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 285 : 709-711.
- JÓNSSON S., 1983 — Effets de la lumière colorée et de quelques autres facteurs sur la formation des gamètes chez l'*Enteromorpha prolifera*, Chlorophycée marine. *J. Mar. Res. Instit. (Reykjavik)* 7 : 61-72.
- KLIS F.M., SAMSON M.R., van ETTEN I., MUSGRAVE A. et van den ENDE H., 1984 — Glycoproteins mediating sexual agglutination in the unicellular alga *Chlamydomonas*

- eugametes*. Identification of the mt^+ agglutination factor. 4e Congrès de la fédération des Sociétés Européennes de Physiologie Végétale. Strasbourg 29/7 à 3/8 1984 : 359.
- KLUT M.E., BISALPUTRA T. et ANTIA N.J., 1983 — Agglutination of the chlorophycean flagellate *Dunaliella tetriolecta* by treatment with lectins or divalent cations at alkaline pH. *J. Phycol.* 19 : 112-115.
- KÖHLER K., 1956 — Entwicklungsgeschichte, Geschlechtsbestimmung und Befruchtung bei *Chaetomorpha*. *Arch. Protist.* 101 : 223-258.
- LAUR M.H. et JÓNSSON S., 1983 — Détection d'acides sialiques ou de substances apparentées chez *Enteromorpha prolifera* (Müller) J. Agardh. *Cryptogamie, Algologie* 4 : 105-110.
- LERSTEN N.R. et VOTH P.D., 1960 — Experimental control of zoid discharge and rhizoid formation in the green alga *Enteromorpha*. *Bot. Gaz.* 122 : 33-45.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951 — Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- MAIER I. et MÜLLER D.G., 1984 — Pheromone action and specificity in sexual reproduction of brown algae of the order Laminariales. 4e Congrès de la fédération des Sociétés Européennes de Physiologie Végétale. Strasbourg 29/7 à 3/8 1984 : 361.
- MÜLLER D.G., PETERS A., GASSMAN G., BOLAND W., MARNER F.-J. et JAENICKE L., 1983 — Identification of a sexual hormone and related substances in the marine brown alga *Desmarestia*. *Naturwissenschaften* 69 : 290-291.
- NILSEN G. et NORDBY Ø., 1975 — A sporulation-inhibiting substance from vegetative thalli of the green alga *Ulva mutabilis*, Føyn. *Planta* 125 : 127-139.
- PROVASOLI L., 1968 — Media and prospects for cultivation of marine algae. Proc. U.S. Jap. Conf. Hakone, Sept. 1966. Jap. Soc. Pl. Physiologists : 63-75, 2 tab.
- SCOTT T.A. et MELVIN E.H., 1953 — Determination of dextran with anthrone. *Analyt. Chem.* 25 : 1656-1661.
- SENGBUSCH, P.v. et MULLER U., 1983 — Distribution of glycoconjugates at algal cell surfaces as monitored by FITC-conjugated lectins. Studies on selected species from Cyanophyta, Pyrrophyta, Raphidophyta, Euglenophyta, Chromophyta and Chlorophyta. *Protoplasma* 114 : 103-113.
- STARR R.C. et JAENICKE L., 1974 — Purification and characterization of the hormone initiating sexual morphogenesis in *Volvox carteri* f. *nagariensis* Iyengar (glycoprotein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 : 1050-1054.
- SVENNERHOLM L., 1957a — Quantitative estimation of sialic acids. I. A colorimetric method with orcinol-chlorhydric acid (Bial's) reagent. *Archiv Kemi* 10 : 577-596.
- SVENNERHOLM L., 1957b — Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric method. *Biochem. Biophys. Acta* 24 : 604-611.
- WARREN L., 1959 — The thiobarbituric acid assay of sialic acid. *J. Biol. Chem.* 234 : 1971-1975.
- WERNER I. et ODIN L., 1952 — On the presence of NAG-NANA in certain glycoproteins and in ganglioside. *Acta Soc. Med. Upsal.* 57 : 230.
- WIESE L. et WIESE W., 1975 — On sexual agglutination and mating substances in isogamous dioecious Chlamydomonas IV. Unilateral inactivation of the sex contact capacity in compatible and incompatible taxa by α -mannosidase and snake venom protease. *Dev. Biol.* 43 : 264-276.
- WILLIAMS L.A., 1981 — A functional structure of the (-)mating type substance in *Chlamydomonas*. *J. Phycol.* 17 (suppl.) : 3.